

ÜBER DIE WIRKUNG EINES
EIWEISSARMEN MILZ - UND SERUMEXTRAKTES
AUS RÖNTGEN - MILZBESTRAHLTEN RATTEN
AUF DAS WEISSE BLUTBILD VON NORMALMÄUSEN UND MÄUSEN
MIT AKUTER LYMPHATISCHER LEUKÄMIE

1972

WILHELM NEUMAYR

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut
für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlenforschung,
assoziiert mit Euratom, München

(Leiter: Professor Dr. W. Stich)

und der

I. Medizinischen Klinik der Universität München,
Abteilung für Hämatologie

(Vorstand: Professor Dr. W. Stich)

**Über die Wirkung eines eiweißarmen Milz- und Serumextraktes
aus röntgenmilzbestrahlten Ratten auf das weiße Blutbild
von Normalmäusen und Mäusen mit akuter lymphatischer Leukämie.**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Wilhelm Neumayr
aus München

München 1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. W. Stich

Mitberichterstatter: Professor Dr. M. Eder

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 1972



Inhaltsverzeichnis

Seite

I.	<u>Einleitung</u>	1
II.	<u>Literaturüberblick</u>	1 - 8
III.	<u>Material und Methodik</u>	9 -13
	1. Herstellung eines Milz - und Serum- extraktes aus röntgenbestrahlten Rattenmilzen	
	2. Untersuchungen über die Wirkung des Milz - und Serumextraktes auf das weiße Blutbild	
	a) Versuche an Normalmäusen	
	b) Versuche an Mäusen mit lymph- tischer Leukämie	
	3. Auswertung	
IV.	<u>Ergebnisse</u>	13-16
	1. Versuche an Normalmäusen	
	a) Die Wirkung von physiologischer Kochsalzlösung	
	b) Die Wirkung des Milzextraktes	
	c) Die Wirkung des Serumextraktes	
	2. Versuche an Mäusen mit lymphatischer Leukämie	
	a) Krankheitsverlauf bei unbehandel- ten Mäusen des Stammes C57 BL/6J nach Tumorübertragung	
	b) Die Wirkung 4 Stunden nach Injek- tion von physiologischer Kochsalz- lösung, Milz - und Serumextrakt 6 Tage nach Tumorübertragung im Ver- gleich zu unbehandelten Mäusen 6 Ta- ge nach Tumorübertragung	
	c) Die Wirkung 4 Stunden nach Injek- tion von physiologischer Kochsalz- lösung, Milz - und Serumextrakt 7 Tage nach Tumorübertragung im Vergleich zu unbehandelten Tieren 7 Tage nach Tumorübertragung	

- d) Die Wirkung 24 Stunden nach
Injektion von physiologischer
Kochsalzlösung, Milz - und
Serumextrakt 6 Tage nach Tu-
morübertragung im Vergleich
zu unbehandelten Tieren 7 Ta-
ge nach Tumorübertragung

V.	<u>Diskussion</u>	17-20
	1. Versuche an Normalmäusen	
	2. Versuche an Lymphadenosemäusen	
VI.	<u>Zusammenfassung</u>	21
VII.	<u>Literaturverzeichnis</u>	22-24

Lebenslauf

I. Einleitung

Schon Erasistratos soll gesagt haben, daß die Natur nichts Überflüssiges geschaffen habe außer der Milz. Die schon lange bekannte Tatsache, daß der Mensch auch ohne Milz leben kann, besagt jedoch nicht, daß die Milz für ihn bedeutungslos ist. Dies offenbart sich besonders bei hämatologischen Systemerkrankungen, bei denen sehr häufig die Milz primär oder sekundär beteiligt ist. Man denke hier insbesondere an die Milzvergrößerung bei malignen Erkrankungen der Blutzellen einerseits und zum anderen an die Wirkung der primär vergrößerten Milz z.B. durch portale Hypertension auf die Hämatopoese. In welchem Umfange und durch welche biologischen Mechanismen die Milz mit dem Blute und seinen Bildungsstätten in Beziehung steht, ist heute noch größtenteils ungeklärt. Die offensichtliche Beteiligung der Milz am hämatopoetischen System rechtfertigt die Suche nach einem therapeutischen Einfluß auf Blutkrankheiten über Milzstoffe.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, den Einfluß von Serum - und Milzextrakt milzbestrahlter Ratten auf das weiße Blutbild bei Normalmäusen und bei Mäusen mit akuter lymphatischer Leukämie zu ermitteln.

II. Literaturüberblick zum Thema

Die Milz ist das einzige Organ des Warmblüters, das zugleich voneinander völlig verschiedene Leistungen vollbringt. Funktionell vereinigt die Milz mehrere Organsysteme in sich, indem sie sich an deren Aufgaben beteiligt oder sie zum Teil ganz übernimmt. Als Blutspeicher hat die Milz je nach Spezies unterschiedliche Bedeutung, man kann sie jedoch unter diesem Gesichtspunkt zu den Kreislauforganen zählen. Die Produktion von Lymphozyten und unter gewissen Umständen auch aller anderen Blutzellen gesellt sie zu den blutbildenden Organen, wobei sie zusätzlich noch das Auftreten pathologischer Erythrozytenarten verhindern kann.

Gleich verschiedenen anderen Organen ist auch die Milz befähigt, biologisch-chemisch höher organisierte Strukturen abzubauen; man denke dabei z.B. nur an

die Beteiligung der Milz an der Blutmauserung. Schließlich stellt die Milz einen bedeutenden Teil des körpereigenen Abwehrsystems dar; sie produziert Antikörper und ist auch ohne die Anwesenheit spezifischer Antikörper zur Phagozytose fähig. Obwohl heute allgemein anerkannt wird, daß die Milz humorale Reize beantwortet (Noradrenalin entleert den Thrombozytenspeicher Milz, Cortison senkt die Lymphozytenzahl), ist ihre Bedeutung als humoral aktiv wirksames Organ noch sehr umstritten.

Der im Vergleich zu anderen Organen einzigartigen Universalität der Milz entsprechend arbeiten die verschiedensten wissenschaftlichen Disziplinen der Medizin an der Erforschung dieses Organs. Dieses Nebeneinander verschiedener Leistungen in einem Organ erschwert naturgemäß die Beurteilung der krankhaft veränderten Milz erheblich, weil sowohl eines oder auch mehrere der genannten Systeme am Krankheitsprozeß beteiligt sein können. Da bei Blutkrankheiten fast immer eine Milzbeteiligung zu beobachten ist, interessiert sich in besonderem Maße die Hämatologie für die Milz und ihre Beziehung zum Blut und blutbildenden System.

Es gibt zur Zeit noch keine allgemeingültigen Aussagen über die Art und Weise der Milzbeteiligung bei hämatologischen Systemerkrankungen. Die uns in der einschlägigen Literatur begegnende Fülle sich widersprechender Ansichten und Theorien sowie der vielen dort dargestellten gegensätzlichen Versuchsergebnisse zeigt, daß man von einem echten Verständnis der Beziehungen zwischen Milz und Blut zur Zeit noch weit entfernt ist.

Nichtsdestoweniger nimmt die Problematik über die Wirkung der Milz auf die Blutbildungsstätten des Knochenmarks mit den sich daraus ergebenden Konsequenzen für das rote und weiße Blutbild einen besonders großen Raum in der hämatologischen Milzliteratur ein. Es geht hier in erster Linie um die Frage, ob die Milz humoral auf das Knochenmark einwirkt, also eine oder mehrere Substanzen produziert, die über eine Wirkung auf das Knochenmark den Bestand des roten und weißen Blutbildes qualitativ und quantitativ regulieren.

Sowohl der normalen als auch der pathologisch veränderten Milz wird ein Einfluß auf das Knochenmark und auf die Blutzellen selbst zuerkannt, wobei die Wirk-

samkeit mit steigender Organgröße zunehmen soll. Der Begriff der "splenogenen Markhemmung" gehört bei uns schon längst zum Allgemeinwissen des Mediziners; man bezeichnet so die geläufige Vorstellung, daß die Milz einen hemmenden Einfluß auf die medulläre Bildung oder die Ausschwemmung von Blutzellen aus dem Knochenmark ausübt. Die allgemeine Ansicht, daß eine pathologisch vergrößerte Milz auch ein mehrfaches ihrer normalen Hemmwirkung zeige, muß durch die Tatsache eingeschränkt werden, daß es auch proliferative Splenomegalien gibt (z.B. Polycythämie, Leukämie), die gewöhnlich mit Leukozytose verbunden sind.

Dagegen ist bei Vorliegen einer Blutzytopenie in charakteristischer Weise das Knochenmark gewöhnlich hyperplastisch. Der Zelltyp, der im Blut erniedrigt ist, ist dann im Knochenmark erhöht.

Möglicherweise ist das von UNGER aus der Milz extrahierte Splenin A und Splenin B zum Teil dafür verantwortlich. Splenin A erhöht die Resistenz der Blutgefäßwand hinsichtlich der Diapedese korpuskulärer Elemente des Blutes und es ist durchaus denkbar, daß so für Blutzellen der Übertritt vom Knochenmark in die Blutbahn erschwert wird. Splenin B hat einen antagonistischen Effekt durch Hemmung der Knochenmarksmegakaryozyten und der sich daraus ergebenden Thrombozytopenie mit der bekannten Möglichkeit einer Hämorrhagie. Das Ausmaß der Thrombozytopenie ist somit durch Splenin B soweit regulierbar, daß die Mark-Blutsschranke für Korpuskeln optimal durchgängig ist, es dabei jedoch andernorts noch nicht zu Hämorrhagien kommt. Die Milz wäre hiermit durch die Produktion von Splenin A und Splenin B als endokrines Organ qualifiziert.

Ein weiterer Funktionszusammenhang besteht zwischen Nebennierenrinde - Milz und Knochenmark. Danach senkt Cortison die Anzahl der Lymphozyten und stimuliert das Knochenmark, d.h., es besteht ein gegensätzlicher Effekt zwischen Milz und Knochenmark in Bezug auf Cortison. Das bekannte biologische Grundprinzip, daß Hormonwirkungen konzentrationsabhängig sind und die auftretenden Konzentrationen wiederum durch einen Regelmechanismus gesteuert werden, läßt den Schluß zu, daß zwischen Nebennierenrinde - Milz und Knochenmark ein hormoneller Rückkopplungsmechanismus besteht, der die Milz wiederum als humoral wirksames Organ darstellt. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden,

daß die Suche nach einem Erythropoetinantagonisten, der auf das Knochenmark gewirkt hätte, in der hypersplenischen Milz einer 16-jährigen Patientin erfolglos blieb.

Es gibt eine Reihe von Versuchen, die ihren Ergebnissen nach die Milz als humorales Organ mit einer spezifischen Wirkung auf das Blut ausweisen. Hierzu gehört schon seit langem die Splenektomie, bei welcher die auffallende Erhöhung der Leukozyten im Vordergrund steht. Versuche mit Ratten ergaben eine postsplenektomiebedingte Leukozytose. Nach Reimplantation von 10 Gewichtsprozent der vorher entnommenen Milz in die Bauchhöhle wurde ein Rückgang der Leukozytose beobachtet. Da der Rückgang der Leukozytenzahlen auch dann stattfand, wenn man das Milzgewebe in eine Dialysekammer mit einer Porengröße von 45 μ verbracht und diese dann erst in den Bauchraum implantiert wurde, kann man auf die Ausschüttung eines humoralen, leukodepressiv wirkenden Faktors aus der Milz schließen.

Mit dieser Annahme korrelieren die Ergebnisse bemerkenswerter therapeutischer Maßnahmen, die bereits von verschiedenen Wissenschaftlern durchgeführt wurden: weitgehend eiweißfreie Extrakte von Hyperspleniemilzen erbrachten i.v. injiziert, eine 3 - 4 monatige Remission bei drei Fällen akuter Leukämie. Obwohl nicht mit der gleichen Regelmäßigkeit, so wurden doch ähnliche Erfolge auch durch Behandlung mit Kälbermilzen erzielt. Derartige Milzextrakte sollen eine größere Ausreifungstendenz unreifer Zellen bewirken und so die Leukozytenzahlen bei akuten Leukämien senken. Der dafür verantwortliche Faktor soll jedoch nicht nur auf das Knochenmark, sondern auch auf leukämische Infiltrate in Lymphknoten, Retina und Haut wirken. Sehr interessant ist hier die etwa 10 Jahre später gemachte Entdeckung, daß durch eiweißfreie Milzextrakte hypersplener Milzen die aus normalen und leukämischen menschlichen Leukozyten stammende Tetrahydrofolat-Formylase (FH₄F) quantitativ gehemmt werden kann. Die vielfach postulierte Hemmwirkung der Milz wird jedoch von einigen Untersuchern nicht anerkannt.

Ein besonderer Einfluß auf das normale und pathologische Blutbild scheint von der röntgenbestrahlten Milz auszugehen. Hier soll durch die Bestrahlung ein Milzfaktor freigesetzt werden, der regulierend auf das Knochenmark einwirkt. Schon seit 1905 werden in

Tübingen Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) durch Milzbestrahlung behandelt. Hierbei ergab sich, daß nach Milzbestrahlung mit 50 - 100 R die Mitosehäufigkeit der unreifen myeloischen Zellen abnahm und im peripheren Blut eine Rechtsverschiebung stattfand, wobei die Serumaktivität der Laktatdehydrogenase wieder in den Normbereich zurückging und die Milz kleiner wurde. Auch die Bestrahlung der normalen Milz wirkt zellverarmend auf das Knochenmark mit Rechtsverschiebung. Eine Ganzkörper- bzw. Knochenmarksbestrahlung bei gleichzeitiger Bleiabdeckung der Milz soll weniger wirksam sein als ausschließliche Milzbestrahlung.

Obwohl Tierexperimente nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind, ergeben sich hinsichtlich der Milzwirkung auf Blut und Knochenmark doch einige Parallelen. Besonders die Milz vom Immunisierungstyp der Nagetiere steht der menschlichen Milz recht nahe. So wurden beispielsweise beobachtet, daß die selektive Milzbestrahlung der Ratte durch P^{32} imprägnierte Kunststoffstreifen einen Abfall der kleinen Lymphozyten im peripheren Blut und im Lymphozytenauswurf des ductus thoracicus auf ca. 4 % der Normalwerte bewirkt.

Vergleichende Untersuchungen haben gezeigt, daß der Lymphozytenabfall durch radioaktive Zerstörung der Lymphozyten zustande kommt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß nach Milzbestrahlung von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie deren Lymphozyten in der Gewebekultur hinsichtlich ihrer immunologischen Antwort das Verhalten gesunder Lymphozyten zeigen.

Verschiedene Versuche sprechen dafür, daß die Milz nach Bestrahlung eine antimitotische Substanz freisetzt, welche im peripheren Blut zirkuliert. So wurden bei Kaninchen die Milzen lokal mit 400 R bestrahlt, sodann das Serum dieser Tiere anderen Kaninchen i.m. injiziert. Durch die verringerten Retikulozytenzahlen nach Seruminjektion wurde auf den antimitotischen Effekt dieses Serums geschlossen.

Auch auf das strahlengeschädigte Knochenmark scheint die Milz eine günstige Wirkung auszuüben. So jedenfalls kann man Versuche deuten, bei denen röntgenbestrahlten Mäusen 1 Std. nach Bestrahlung Milzhomogenat injiziert wurde. Die Folge war eine dosisabhängige Überlebensrate und eine ebenfalls dosisabhängige Ver-

hinderung des üblichen Gewichtsverlustes. Andere Experimente sollten beweisen, daß dieser schützende Faktor tatsächlich von der Milz gebildet wird. Man hat dabei Blut für zwei Stichproben aus der Milzvene von Kaninchen entnommen, wobei die Milz nach der Entnahme von 10 - 25 ml Blut kollabierte und flach blieb. Das Serum der beiden Blutproben wurde mit 1.000 R bestrahlten Kaninchen injiziert, dabei zeigte sich, daß die erste Probe eine stark signifikante Lebensverlängerung zur Folge hatte, dagegen war die Wirkung der zweiten Probe weitaus weniger wirksam. Dieser Versuch zeigt, daß der protektive Faktor von der Milz an das Blut abgegeben wird. Allerdings sind andere Autoren der Meinung, daß gerade die Splenektomie einen protektiven Effekt auf die Blutbildung nach Ganzkörperbestrahlung mit subletalen Dosen habe.

Auch 19 S - Serum alpha Makroglobulin soll die Regeneration des strahlengeschädigten, blutbildenden Gewebes beschleunigen; der dabei zugrundeliegende Wirkungsmechanismus ist allerdings noch ungeklärt.

In anderen Versuchen wurde festgestellt, daß 2 - 40 Stunden nach Ganzkörperbestrahlung von Ratten mit 300 R die Aktivität der l-Aminosäureoxydase in Milzmitochondrien deutlich erniedrigt, die Aktivität der Butyryl CoA Dehydrogenase nach 8 Stunden p.r. dagegen deutlich erhöht war; die Lebermitochondrien blieben unbeeinflusst.

Hieraus lassen sich Zusammenhänge ableiten: 19 S - alpha Makroglobulin hemmt intrazellulär die Endopeptidasen, während die l - Aminosäureoxydase als Exopeptidase von sich aus schon durch Bestrahlung in den Milzmitochondrien erniedrigt ist; so wird die intrazelluläre Proteolyse einerseits gehemmt, und andererseits werden durch die nach Bestrahlung auftretende Aktivitätserhöhung der Butyryl CoA Dehydrogenase die für Biosynthesen wichtigen Reduktionsäquivalente vermehrt bereitgestellt. Es ist durchaus denkbar, daß diese Aktivitätsänderungen von Enzymen aus Milzmitochondrien im blutbildenden Knochenmark wirksam werden.

Bei der selektiven Milzbestrahlung treten gegenüber der Ganzkörperbestrahlung andere Beobachtungen in den Vordergrund, dabei fällt in erster Linie der explosionsartige Zerfall der Lymphfollikel auf, welcher unabhängig von der Zellteilungstätigkeit ist und sein Maxi-

mum etwa 6 Stunden p.r. erreicht. Bei der lokalen Milzbestrahlung von Ratten mit 600 R ist bereits nach 2 Stunden ein ausgedehnter Zerfall von Lymphozyten in den Lymphfollikeln zu erkennen.

Es gibt Autoren, welche die Kontrolle der Leukopoese auf einen Rückkopplungsmechanismus zurückführen, der durch die Auflösungsprodukte von Leukozyten hervorgerufen wird. Sie haben festgestellt, daß das Wachstum von Stammzellen aus dem Blut eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie durch deren Inkubation in Serum milzbestrahlter Patienten mit CML gehindert wird, wobei das Serum 1 Stunde nach Bestrahlung gewonnen wurde. Demgegenüber konnte das gleichermaßen gewonnene Serum eines tumorbestrahlten Patienten mit Lungenmetastasen diese Wirkung nicht erbringen. Es soll damit bewiesen sein, daß die Wachstumshemmung von myeloischen Stammzellen nicht auf durch Bestrahlung aus dem Blut hervorgegangene, kurzlebige Radikale zurückzuführen ist. Viele Untersuchungen sprechen dafür, daß Röntgenstrahlen in erster Linie Veränderungen im Zellkern hervorrufen. Werden z.B. Thymus und Milz einer Röntgenbestrahlung ausgesetzt, dann wird in diesen Organzellen die Bindung der DNA an die Histone der Desoxyribonukleoproteide (DNP) so stark vermindert, daß sich die DNA in Lösungen bestimmter Ionenstärke von DNP trennt und in die Lösung übergeht, wobei die Histone an Heparin gebunden werden.

Bemerkenswert ist hierbei, daß dies bei gleichermaßen bestrahltem Leber - und Nierengewebe und bei unbestrahltem Thymus und Milz nicht der Fall ist. In anderen Experimenten wurde gefunden, daß im röntgenbestrahlten lymphatischen Gewebe durch die Wirkung einer Desoxyribonuklease I - ähnlichen Endonuklease aus DNA Polydesoxyribonukleotide entstehen. Eine Wirkung von DNA oder Polydesoxyribonukleotiden aus röntgenbestrahltem lymphatischen Gewebe auf das hämopoetische System wird nicht beschrieben.

Anders verhält es sich mit der RNA: Knochenmarkszellen einer akuten Leukämie verbrachte man in eine Suspension mit RNA, hergestellt aus embryonalen Kälbermilzen. Dabei wurde festgestellt, daß diese Zellen in der Suspension mehr Sauerstoff verbrauchten als normale Tumorzellen, auch leukämische Zellsuspensionen ohne RNA hatten einen signifikant geringeren Sauerstoffverbrauch. Diese Stoffwechseländerung soll sich in der Weise vollziehen, daß durch den Einbau

von RNA aus lymphatischem Gewebe eine den Stoffwechsel betreffende normale Informationsübertragung innerhalb maligner Leukozyten ermöglicht wird. Eine derartige Informationsübertragung durch RNA kann sich jedoch nur innerhalb hämopoetischer Zellen vollziehen. Bei einer ähnlich erwarteten Wirkung in vivo muß vorausgesetzt werden, daß die Milz ihre RNA an das Blut abgibt.

Der Versuch, eine Milzwirkung auf das weiße Blutbild durch Übertragung regulativ wirksamer Informationen mittels Nukleinsäuren auf Leukozyten zu erklären ist sehr bestechend, doch handelt es sich auch hier lediglich um eine Hypothese. Wegen der Vielfalt heute noch bestehender Meinungen über die Beteiligung der Milz an der Hämpoese ist es z.Zt. nicht möglich, sich auf dem Wege über ein intensives Literaturstudium ein abschließendes Urteil hierüber zu bilden.

III. Material und Methodik

1. Herstellung eines Milz- und Serumextraktes aus röntgenbestrahlten Rattenmilzen:

200 bis 250 g schwere Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts wurden zur Milzbestrahlung in einen Kunststoffblock verbracht, der für Ratten körpergerecht ausgehöhlt war. Zur Abschirmung wurde eine 6 mm starke Bleiplatte verwendet, in welcher die Milzregion in der Größe der auf die Haut projizierten Milz ausgespart war.

Um Knochenmarksbestrahlungen durch spontane Lageveränderungen der Tiere zu verhindern, wurden diese mit 0,5 ml einer 0,5 g %igen Evipan [®] - Lösung i.p. für 20 min. voll narkotisiert.

Als Strahlenquelle diente eine herkömmliche Röntgenröhre, welche bei 180 kv und 14 mA im Abstand von 22,5 cm (Filter: 0,6 mm Cu, 1 mm Al) eine Dosisleistung von 142 R/min. erbrachte.

Pro Tier wurden 600 R auf die Milz appliziert, dazu war bei der angegebenen Dosisleistung eine Bestrahlungsdauer von 4 min 13,5 sec. erforderlich.

6 Stunden nach der Milzbestrahlung wurden den Ratten unter der bereits erwähnten Vollnarkose die Milz und das Blut entnommen. Nach 10 min. langem Zentrifugieren des Blutes mit 3.500 U/min. bei Raumtemperatur konnte das überstehende Serum abpipettiert werden. Das so gewonnene Serum wurde in einen Dialysierschlauch verbracht und dieser dann für 24 Stunden bei + 4⁰ C in die 20-fache Menge aqua dest. gelegt. Durch Zugabe von 5 mg Penicillin sollte ein Bakterienwachstum im Dialysat weitgehend verhindert werden.

Die Milzen wurden in der 5-fachen Gewichtsmenge aqua dest. und ca. 5 mg Penicillin mit einem Turbo-Mix homogenisiert und das Milzhomogenat in der gleichen Weise wie das Serum, jedoch nur gegen die 10-fache Menge aqua dest. dialysiert.

Die weitere Behandlung der Dialysate erfolgte im Vakuumdestillator bei 40⁰ C bis zur völligen Trocknung der gelösten Bestandteile. Diese wurden

sodann in 80 ml mit 5 mg Penicillin versetztem aqua bidest. gelöst. Zum Entsalzen wurde diese Lösung nun langsam durch eine mit Sephadex[®] G 10 (13, 16) gefüllte Chromatographiesäule mit den Abmessungen 600 x 55 mm gepumpt, das der Säulenspreizung des aufgetragenen Materials entsprechende Eluat (Ausschlußvolumen) gesammelt und erneut bei 40° C im Vakuumdestillator getrocknet. Der verbleibende Rückstand wurde ein zweites Mal (s.o.) der Gelfiltration unterzogen und wiederum bei 40° C getrocknet.

Nunmehr wurde der verbleibende Rest des Milzdialysates im Gewichtsverhältnis 5:1 und der des Serumdialysates im Volumenverhältnis 10:1 der Ausgangsmaterialien in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Nach Zusatz geringer Mengen Penicillin erfolgte die Lagerung der Extrakte in einer Tiefkühltruhe bei -17° C.

Bei dem angewandten Dialysierschlauch handelt es sich um ein Produkt der Firma VISKING. Der Schlauch trägt die Typenbezeichnung 27/32, er hat eine Dicke von 0,025 mm und ist bei der Porengröße von 15-20 ⁰ A nur für Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 10.000 - 20.000 durchgängig (die Porenerweiterung bei der Dehnung im gefüllten Zustand ist hierbei berücksichtigt).

Die Extrakte waren auf Grund der Porengröße praktisch eiweißfrei, photometrische Untersuchungen ergaben einen Wert von 0,006 g %. Da bei der photometrischen Eiweißbestimmung alle Peptidbindungen erfasst werden, kann es sich bei dem angegebenen Wert lediglich um Polypeptide bis zu einem Molekulargewicht im angegebenen Grenzbereich handeln.

Sephadex[®] G 10 hat einen Fraktionierungsbereich bis zu einem Molekulargewicht von 700, somit wurden alle Elektrolyte mit einem Molekulargewicht innerhalb dieses Fraktionierungsbereiches vom Dialysat getrennt (26).

Flammenphotometrische Untersuchungen der gesammelten Eluate wiesen diese als elektrolytfrei aus.

2. Untersuchungen über die Wirkung des Milz- und Serumextraktes auf das weiße Blutbild.

a) Versuche an Normalmäusen:

Die hier verwandten Tiere des Stammes NMRI/Han kamen aus dem Zentralinstitut für Laboratoriumstiere in Hannover, sie waren weiblichen Geschlechts, etwa 6 Monate alt und hatten ein Gewicht von 16 - 20 g.

Die einzelnen Versuche wurden jeweils an Kollektiven, bestehend aus 10 Mäusen durchgeführt. Bei einer Gruppe von 4 solcher Kollektive wurde pro Tier 0,1 ml Milzextrakt (entsprechend 0,5 g Milz) intraperitoneal injiziert. In einer zweiten Gruppe von 4 Kollektiven wurde je Tier 0,1 ml Serumextrakt (entsprechend 1 ml Serum) i.p. verabreicht.

Um Leerwerte zu ermitteln, wurde schließlich eine dritte Gruppe von ebenfalls 4 Kollektiven mit 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p. pro Tier behandelt.

Zur Injektion sind handelsübliche Tuberkulinspritzen und Einmalkanülen Nr. 17 verwendet worden. Die Einstichstelle wurde vor jeder Injektion mit Merphen® desinfiziert.

Nunmehr wurden aus drei Kollektiven bestehende Serien aufgestellt, wobei in den einzelnen Serien je ein Kollektiv aus jeder der drei Gruppen enthalten war. In zeitlichen Abständen von 4, 24, 48 und 72 Stunden erfolgte bei jeweils einer der vier Serien eine Blutentnahme von der Menge, die zum Füllen einer Zählpipette und zur Anfertigung eines Blutausriches erforderlich war. Das Blut konnte nach Querschnitt einer Schwanzvene mit einer Rasierklinge entnommen werden. Die Erythrozyten und Leukozyten eines jeden Tieres wurden mit einem Gerät der Firma COULTER ELECTRONICS, London, gezählt. Alle Blutausriche wurden nach der Methode von PAPPENHEIM gefärbt und mit der Auszählung von jeweils 200 Leukozyten differenziert. Zu Vergleichszwecken wurden bei einer Gruppe von 50 unbehandelten Mäusen Normalwerte auf die gleiche Weise ermittelt.

b) Versuche an Mäusen mit lymphatischer Leukämie:

Bei diesen Versuchen kamen 16 - 20 g schwere, weibliche Tiere des Stammes C57 BL/6J aus den Jackson Laboratories (U.S.A., Chicago) zur Verwendung. Es handelt sich hierbei um einen Inzuchtstamm, bei dem zufällig eine spontan entstandene Lymphadenose entdeckt wurde. Es stellte sich heraus, daß diese Erkrankung durch Transplantation einer Suspension von Zellen der stark vergrößerten Milz innerhalb des Stammes fortlaufend übertragbar ist, die Empfängertiere zeigen dann bereits nach 6 Tagen das Vollbild einer akuten Lymphadenose.

In einer ersten Versuchsreihe wurden 100 Mäusen, pro Tier ca. 10 Millionen Zellen aus Lymphadenosemilzen, i.p. injiziert. Nach 6 Tagen wurden drei Gruppen zu je 30 Tieren wie bei Versuch a) mit physiologischer Kochsalzlösung, Milz- und Serumextrakt behandelt. Die Blutentnahme erfolgte in zwei Serien nach 4 und 24 Stunden. Wegen der zu erwartenden Sterblichkeit mußten hier Kollektive von 15 Tieren aufgestellt werden. 10 Tiere blieben unbehandelt; sie wurden in zwei Kollektive zu je 5 Mäusen aufgeteilt. Bei dem einen Kollektiv erfolgte die Blutentnahme nach 6 Tagen und 4 Stunden, bei dem anderen nach 7 Tagen.

Nach den bereits beschriebenen Methoden wurden von jedem Tier der Erythrozyten- und Leukozytenwert ermittelt sowie ein Blutaussstrich angefertigt. In der gleichen Weise wurde ein 4-Stundenversuch mit physiologischer Kochsalzlösung, Milz- und Serumextrakt 7 Tage nach Tumorübertragung durchgeführt.

3. Auswertung

Bei den geringen Fallzahlen in den Kollektiven ist eine Normalverteilung der gefundenen Werte unwahrscheinlich. Deshalb wurden die Unterschiede zwischen den Ergebnissen zum Vergleich geeigneter Versuche nach dem WILCOXON-Test für zwei Stichproben ermittelt (27, 28).

Da das nach III./1.) hergestellte Milz- und Serumextrakt bisher erstmalig verwendet wurde, konnte bezüglich einer Wirkung keine Testrichtung vorbestimmt werden. Es mußte daher trotz der größeren Mächtigkeit einseitiger Tests der zweiseitige Test angewendet werden (27, 28).

Die Berechnung der Rangsummen erfolgte durch EDV mit IBM Modell 370/155.

Die Signifikanzschranken wurden der DOKUMENTA GEIGY : Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage, J.R. GEIGY A.G., Pharma, Basel (1969) entnommen. Hier vorkommende approximierte Schranken beruhen auf der normalen Approximation mit empirischer Kontinuitätskorrektur.

IV. Ergebnisse

1. Versuche an Normalmäusen:

a) Die Wirkung von physiologischer Kochsalzlösung:

4 Stunden nach der Injektion von 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (NO) eine massive Leukozytose ohne Veränderung des Differentialblutbildes, jedoch war dieser Effekt bereits 24 Stunden nach der Injektion nicht mehr nachzuweisen.

b) Die Wirkung des Milzextraktes: (siehe Abb. 1 und 2)

Nach Ablauf von 4 und 24 Stunden nach der Injektion des Milzextraktes zeigte sich ein hoch signifikanter Abfall der Leukozyten im Vergleich zu NaCl-Tieren. Zugleich waren der prozentuale und absolute Anteil der Lymphozyten stark erniedrigt, der prozentuale und absolute Anteil der neutrophilen Granulozyten dagegen stark erhöht.

48 Stunden nach Milzextraktinjektion ergab sich gegenüber 0,9 % NaCl-Injektion nur ein sehr geringer Abfall der Leukozyten. Die prozentuale

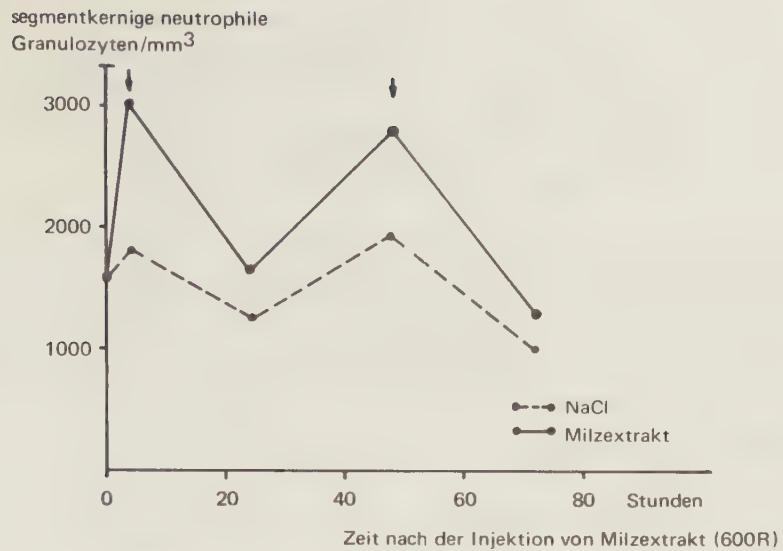


Abb. 1 Abszisse=Zeit nach der Injektion von Milzextrakt, Ordinate=Anzahl der segment-kernigen neutrophilen Granulozyten/mm³ Blut. Die durchgehende Linie zeigt die Werte nach Milzextraktinjektion, die gestrichelte Linie die Werte nach Injektion von 0,9%iger NaCl-Lösung. Die signifikanten Unterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet.

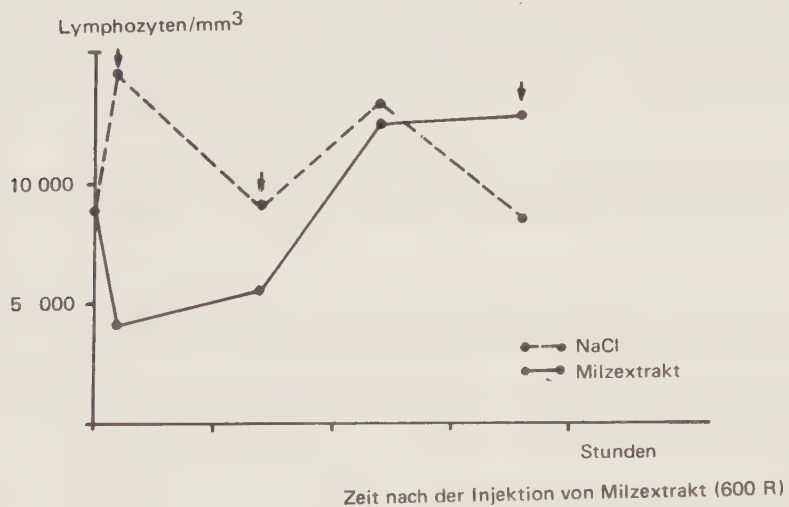


Abb. 2 Abszisse=Zeit nach der Injektion von Milzextrakt, Ordinate=Anzahl der Lymphozyten/mm³ Blut. Die durchgehende Linie zeigt die Werte nach Milzextraktinjektion, die gestrichelte Linie die Werte nach Injektion von 0,9%iger NaCl-Lösung. Die signifikanten Unterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet.

und absolute Lymphozytenzahl war im Vergleich zu NaCl-Tieren nur noch gering erniedrigt. Die noch nach 24 Stunden beobachtete Granulozytose war nach 48 Stunden gegenüber NaCl-Tieren nur mehr gering ausgeprägt.

Nach 72 Stunden lagen die Leukozytenwerte über denen von NaCl-Tieren, während auch der absolute Anteil der Lymphozyten signifikant erhöht war. Es ergaben sich hinsichtlich der Lymphozytenkonzentration und der Konzentration der Segmentkernigen keine signifikanten Unterschiede mehr.

c) Die Wirkung des Serumextraktes:
(siehe Abb. 3 und 4)

Die Wirkung 4 und 24 Stunden nach Serumextraktinjektion entspricht derjenigen nach Milzextraktinjektion; lediglich die Erhöhung der Segmentkernigen war im Vergleich zu NaCl-Tieren weniger ausgeprägt.

Nach 48 Stunden waren die Leukozyten und die Zahl der absoluten Lymphozyten gegenüber den NaCl-Tieren noch hoch signifikant erniedrigt; die segmentkernigen Granulozyten zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Nach 72 Stunden bestanden keine wesentlichen Unterschiede mehr gegenüber den NaCl-Tieren.

2. Versuche an Mäusen mit lymphatischer Leukämie:

a) Krankheitsverlauf bei unbehandelten Mäusen des Stammes C57 BL/6J nach Tumorübertragung:

Bis zum dritten Tage nach Implantation der Tumorzellen fällt die Leukozytenzahl stetig bis auf ein Drittel des für diesen Stamm geltenden Normalwertes von 15.000 Zellen ab. Nun folgt ein rascher Anstieg, so daß am 7. Tage der durchschnittliche Höchstwert von 65.000 Zellen erreicht wird. Die Leukozytenzahl sinkt dann bis zum 8. Tage auf 47.000, ist am 9. Tag wieder auf 57.000 erhöht und fällt nunmehr endgültig auf 20.000 am 11. Tage. Zum Absterbezeitpunkt am 13. und 14. Tag findet man eine Leuko-

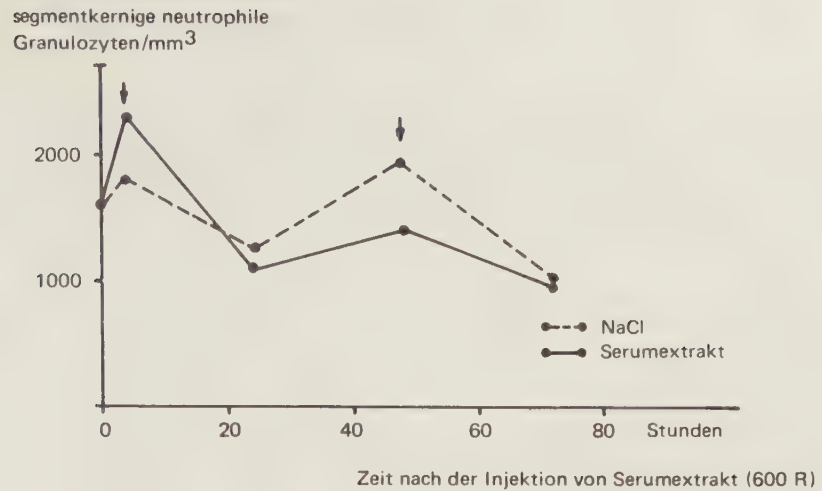


Abb. 3 Abszisse=Zeit nach der Injektion von Serumextrakt, Ordinate=Anzahl der segment-kernigen neutrophilen Granulozyten/mm³ Blut. Die durchgezogene Linie zeigt die Werte nach Serumextraktinjektion, die gestrichelte Linie die Werte nach Injektion von 0,9%iger NaCl-Lösung. Die signifikanten Unterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet.

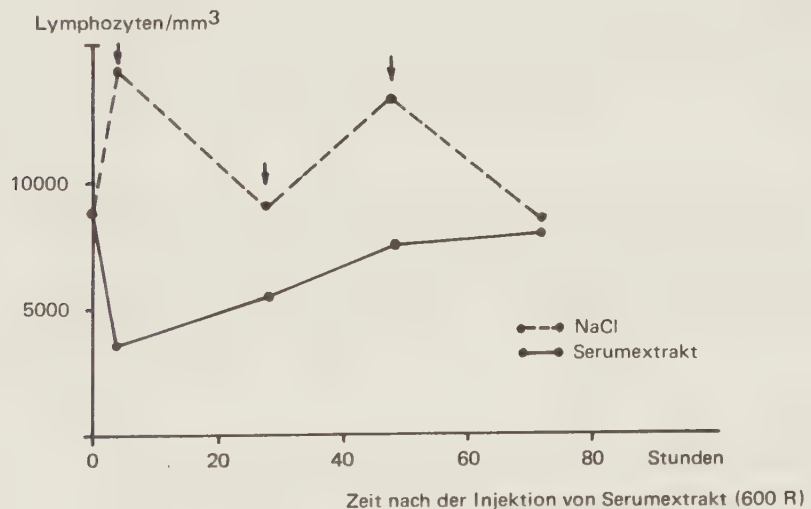


Abb. 4 Abszisse=Zeit nach der Injektion von Serumextrakt, Ordinate=Anzahl der Lymphozyten/mm³ Blut. Die durchgezogene Linie zeigt die Werte nach Serumextraktinjektion, die gestrichelte Linie die Werte nach Injektion von 0,9%iger NaCl-Lösung. Die signifikanten Unterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet.

penie bis zu etwa 1.000 Zellen/mm³ als unterste Grenze (siehe Abb. 5).

Am 11. Tage sind die Erythrozyten bis auf weniger als 50 % der Normalwerte vermindert, in Mediastinum, Lymphknoten, Lunge und Gehirn findet man ausgedehnte Blutungen.

Die Lymphozyten fallen bis zum 3. Tage von 87 rel.% auf 51 rel% bzw. von 13.500 auf 2.000 mm³. Vom 3. bis zum 7. Tage steigt die Zahl der Lymphozyten bis zum Höchstwert von 54.500, fällt am 8. Tag auf 37.000, steigt am 9. Tag wieder auf 49.000 und fällt danach endgültig auf 20.000 am 11. Tage. Der normale prozentuale Anteil von 87 rel.% wird jedoch erst wieder zwischen dem 10. und 11. Tage erreicht.

Die neutrophilen Granulozyten steigen am 2. Tag von 7,5 rel.% auf 30,5 rel.%, nach dem 3. Tag beginnt ein Rückgang der prozentualen Anteile bis auf Null am 11. Tage, so daß hier praktisch nur noch Lymphozyten im Blutaussstrich zu finden sind. Die absolute Zahl der Segmentkernigen steigt bis zum 6. Tag von 1.500/mm³ auf 13.000 und fällt anschließend stetig bis auf Null (siehe Abb. 6 und 7).

- b) Die Wirkung 4 Stunden nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung, Milz- und Serumextrakt 6 Tage nach Tumorübertragung im Vergleich zu unbehandelten Mäusen 6 Tage nach Tumorübertragung:

Die Injektion von Kochsalzlösung veränderte das weiße Blutbild nicht. Nach Milzextraktinjektion erfolgte eine deutliche Senkung der Leukozytenkonzentration sowie der prozentualen und absoluten Anteile der neutrophilen Granulozyten. Die prozentualen Anteile der Lymphozyten blieben unbeeinflusst, obwohl ihre absolute Anzahl geringfügig sank.

Die Serumextraktinjektion bewirkte einen hoch signifikanten Abfall der Leukozytenkonzentration und der absoluten Lymphozytenkonzentration; ebenso waren die Segmentkernigen deutlich erniedrigt, obwohl deren prozentuale Anteile fast unverändert blieben.

Leukozytenzahlen in Tausend

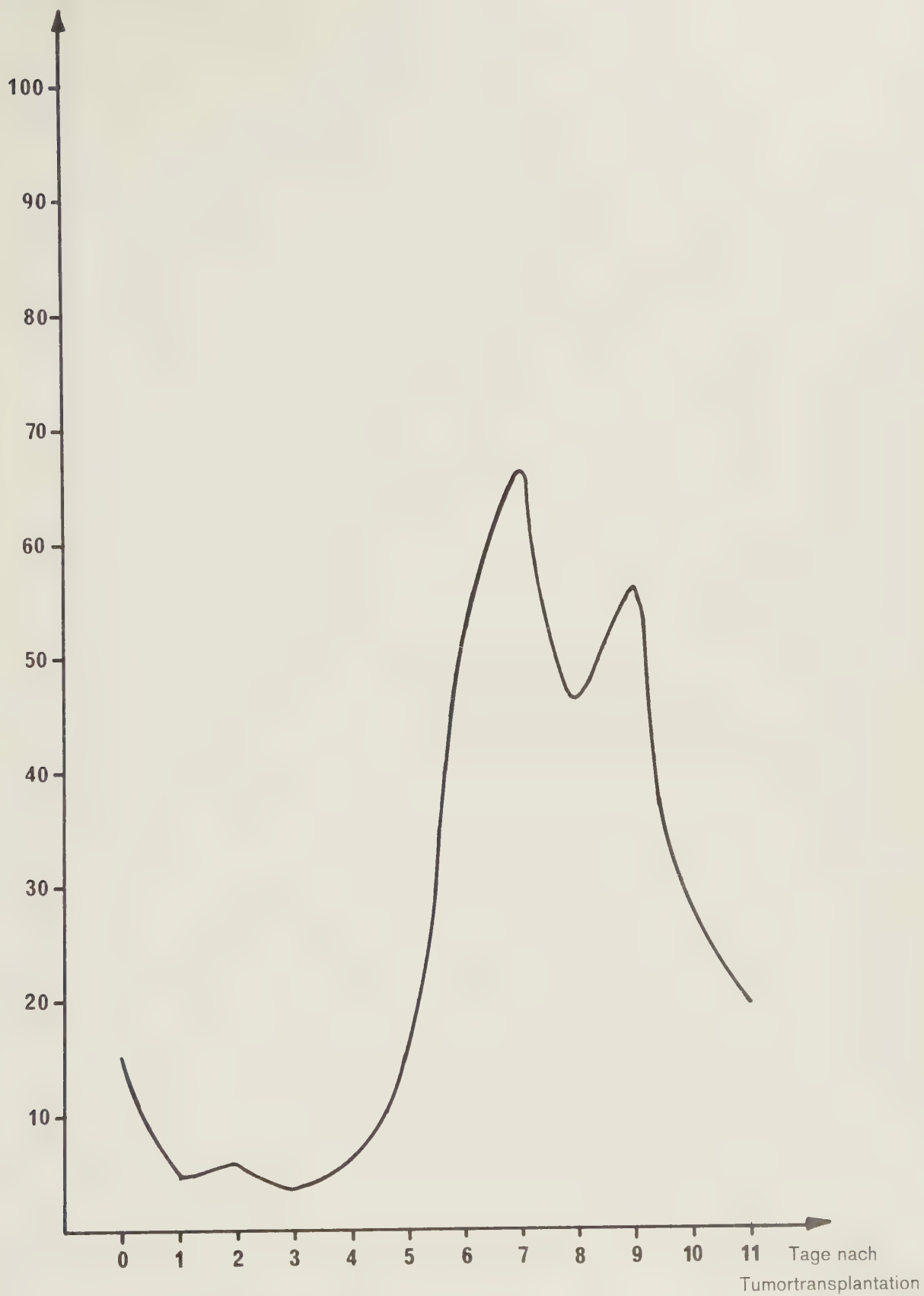


Abb. 5: Veränderung der Leukozytenzahlen nach Tumortransplantation.



Abb. 6: Veränderung der prozentualen Verteilung von Lymphozyten und Granulozyten nach Tumortransplantation.

Leukozytenzahlen in Tausend

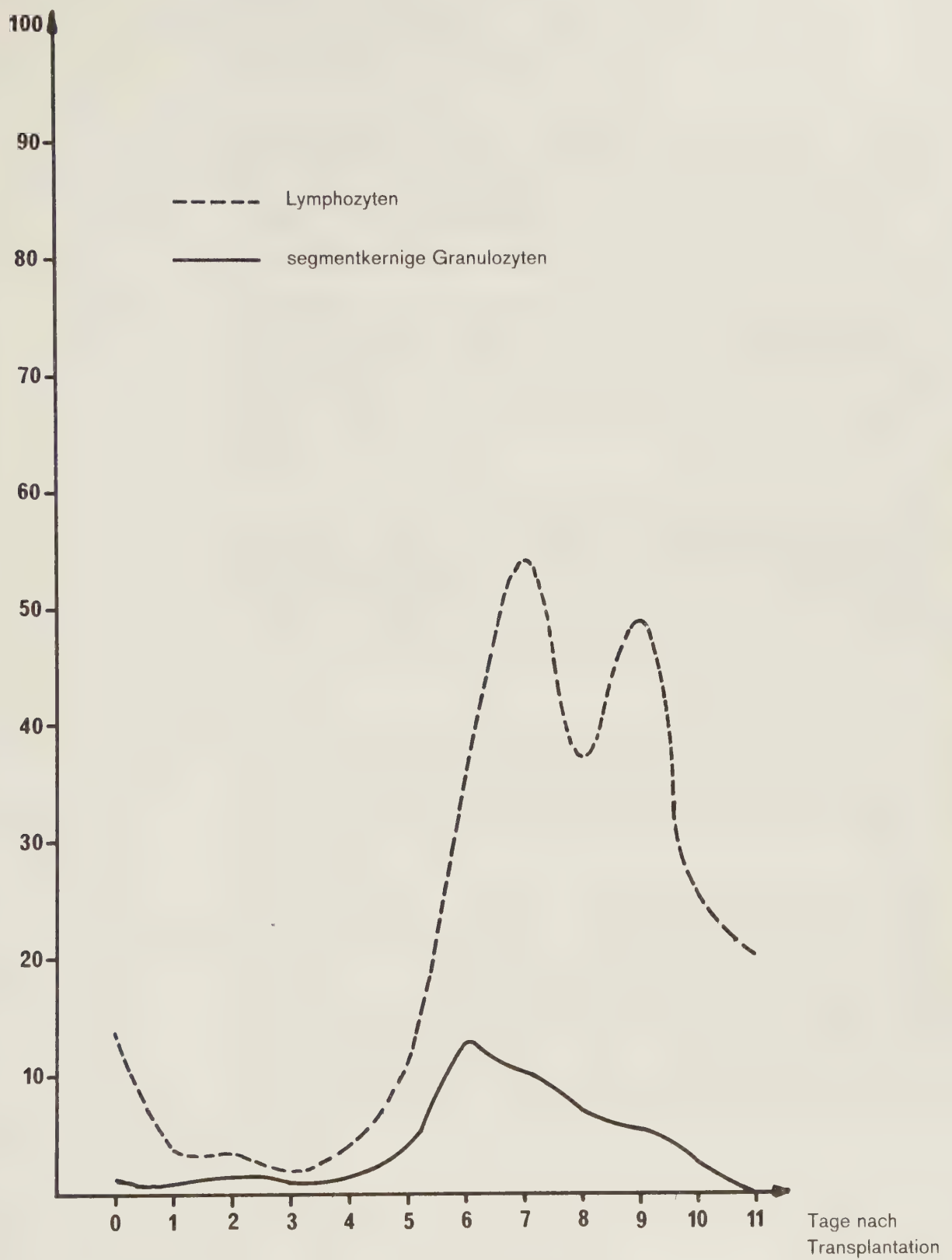


Abb. 7: Veränderung der absoluten Anzahl von Lymphozyten und Granulozyten nach Tumortransplantation

- c) Die Wirkung 4 Stunden nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung, Milz - und Serumextrakt 7 Tage nach Tumorübertragung im Vergleich zu unbehandelten Tieren 7 Tage nach Tumorübertragung:

Der Kochsalzeffekt besteht hier in einer hochgradigen Verminderung der Leukozyten, sowie der prozentualen und absoluten Anteile der Lymphozyten. Die Segmentkernigen waren prozentual deutlich erhöht, absolut jedoch unverändert.

Der Milzextrakt senkt hoch signifikant Leukozyten und die absoluten Werte der Lymphozyten und Segmentkernigen. Der prozentuale Anteil der Lymphozyten fiel nur geringfügig ab, der prozentuale Anteil der Segmentkernigen blieb unverändert.

Nach Serumextraktinjektion sank die Leukozytenkonzentration und Lymphozytenkonzentration absolut geringfügig, wogegen die prozentualen und absoluten Anteile der neutrophilen Granulozyten sehr deutlich verringert wurden. Der prozentuale Anteil der Lymphozyten blieb unverändert.

- d) Die Wirkung 24 Stunden nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung, Milz - und Serumextrakt 6 Tage nach Tumorübertragung im Vergleich zu unbehandelten Tieren 7 Tage nach Tumorübertragung:

Nach Kochsalzinjektion sanken die prozentualen und absoluten Anteile der Lymphozyten geringfügig. Die Leukozytenkonzentration und die Konzentration der segmentkernigen Granulozyten blieben unverändert. Auf die Milzextraktinjektion erfolgte ein geringer Abfall der absoluten Werte der Segmentkernigen. Die Serumextraktinjektion erbrachte keinerlei Veränderungen des weißen Blutbildes.

V. Diskussion

1. Versuche an Normalmäusen:

Bei den durchgeführten Versuchen zeigte sich, daß die Injektion von eiweißfreiem Extrakt aus röntgenbestrahlten Rattenmilzen bei der Maus eine ausgeprägte Leukopenie, Lymphopenie und Granulozytose bewirkt (siehe Abb. 8).

Die Tatsache, daß die Injektion eines eiweißfreien Serumextraktes milzbestrahlter Ratten die gleiche Wirkung hervorrief, spricht dafür, daß die Milz einen diesbezüglich wirksamen Faktor an das Blut abgegeben hat.

Die Wirkung beider Extrakte war nach 24 Stunden noch sehr ausgeprägt, nach 48 gering und nach 72 Stunden nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 9).

Es ist heute unbestritten, daß auch die nichtbestrahlte Milz oder daraus gefertigte Extrakte auf das weiße Blutbild einwirken. V. ALBERT hat in vitro-Versuchen nachgewiesen, daß eiweißfreier Milzextrakt die aus Leukozyten stammende Tetrahydrofolat-Formylase hemmt (1), dadurch wird die Purinsynthese im Nukleinsäurestoffwechsel und folglich auch die Proliferation der Leukozyten verringert. Der so erklärbare leukodepressive Effekt einer hypersplenischen Milz beruht hierbei auf einer chronisch verminderten Leukozytenproduktion infolge einer Enzymhemmung im Kernstoffwechsel.

Sehr deutlich offenbart sich ein leukodepressiver Effekt der unbestrahlten Milz in einer regelmäßig auftretenden, postsplenektomiebedingten Leukozytose (7, 17, 22), doch darüberhinaus fanden TARNUZI und SMILEY noch, daß die Reimplantation von Milzgewebe in splenektomierte Ratten deren Leukozytose verringert (22). Allerdings sinken dabei die Leukozytenzahlen nicht wieder auf die Normalwerte zurück.

Gemäß PRIBILLA wird die Leukozytose nach Splenektomie durch Granulozytenvermehrung bei gleichzeitiger Lymphopenie hervorgerufen (17), was eindeutig für eine Knochenmarkshemmung durch die Milz spricht.

Zur Klärung von Wirkungsmechanismus und Angriffspunkt

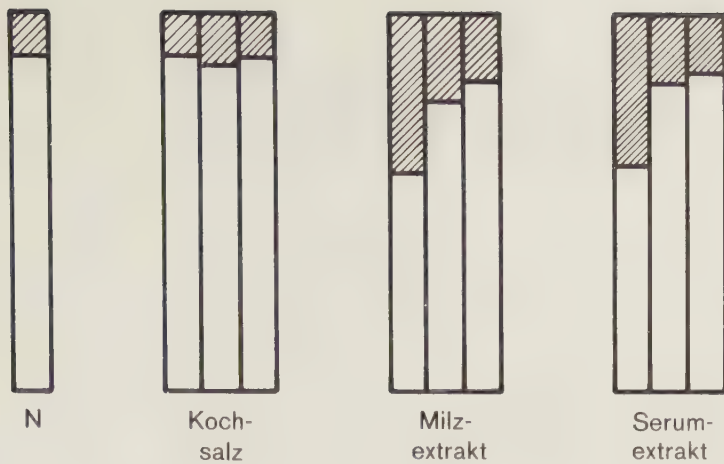


Abb. 8: Veränderung der prozentualen Anteile der Lymphozyten zu den neutrophilen Granulozyten nach Injektion von Milz- und Serumextrakt. Die Gesamtlänge einer Säule entspricht 100%, die Säulenanzahl von links nach rechts entspricht der Blutabnahme von jeweils 4, 24 und 48 Stunden.

N = normale Verteilung von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut bei Normalmäusen.

Schraffiert = Granulozyten.

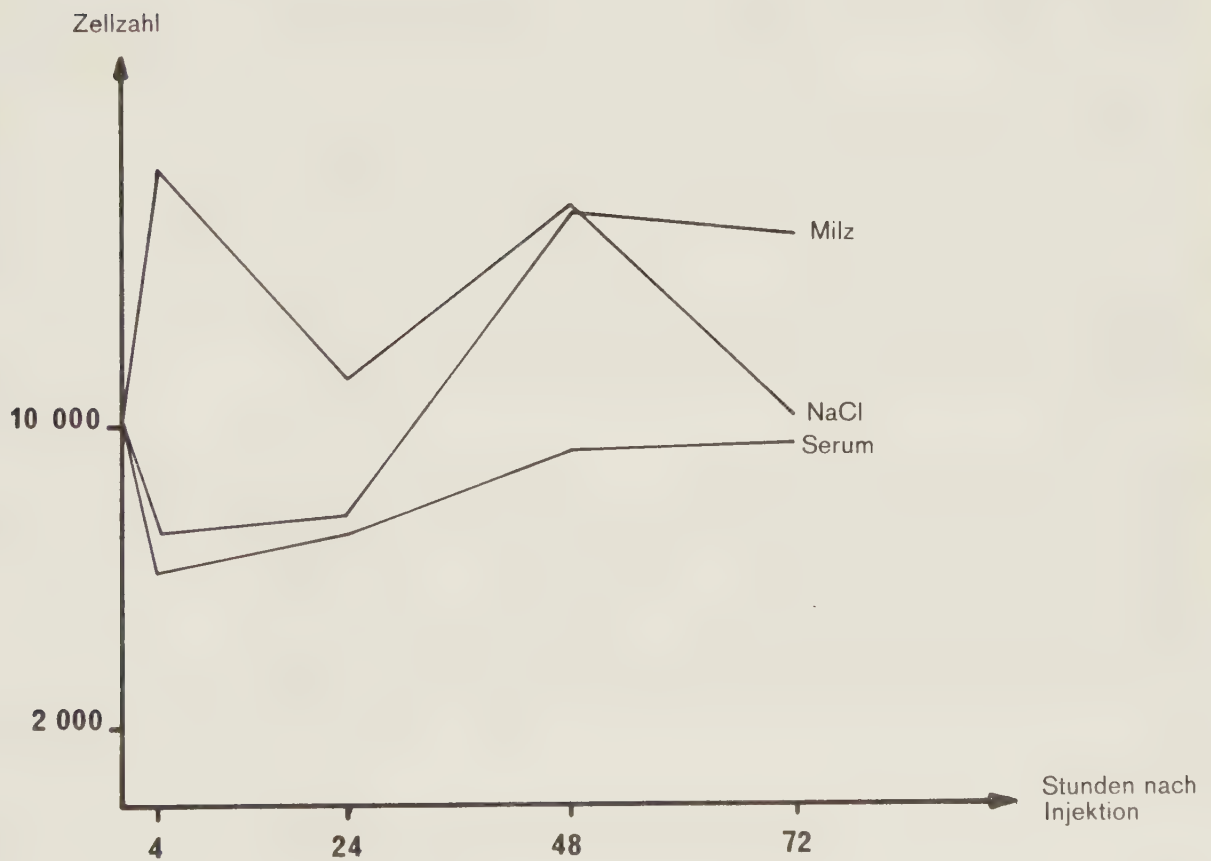


Abb. 9: Veränderung der Leukozytenzahlen nach Milz- und Serumextraktinjektion im Vergleich zu den NaCl-Werten.

dieser Substanzen steht die Analyse der durch sie hervorgerufenen Reaktionen des Organismus der Versuchstiere zur Verfügung:

1. Granulozytose
2. Lymphopenie
3. Leukopenie

Unter Berücksichtigung allgemeingültiger, biologischer Grunderkenntnisse sei angenommen, daß

- a) die bei unseren Versuchen vermehrt produzierten Granulozyten dem Knochenmark der Versuchstiere entstammen, denn der plötzliche Anstieg der Granulozyten um das Dreifache des Normalwertes kann mit einer beschleunigt stattfindenden Ausreifung myeloischer Vorstufen und deren Ausschwemmung aus dem Knochenmark erklärt werden.
- b) die Lymphopenie durch einen Lymphozytenzerfall oder Emigration der Lymphozyten aus der Blutbahn bzw. beides bedingt ist.
- c) bei gesunden Tieren der Leukozytengehalt des Blutes von Milz und Knochenmark beeinflusst und durch Regelmechanismen im Normbereich gehalten wird.
- d) die zahlenmäßigen Anteile von Lymphozyten und Granulozyten im peripheren Blut nur im Bereich bestimmter Zahlenverhältnisse der Norm entsprechen.

Gemessen an den hier genannten Voraussetzungen verhielt sich bei unseren Versuchen das hämopoetische System der Versuchstiere nach Extraktinjektion so, als müßte es hinsichtlich des Differentialblutbildes und der absoluten Lymphozytenzahl eine Lymphozytose kompensieren, das heißt also, die Granulozytenzahl erhöhen und die Lymphozytenzahl senken.

2. Versuche an Lymphadenosemäusen:

Der Krankheitsverlauf dieser Tiere zeigte in den ersten drei Tagen ähnliche Veränderungen des weissen Blutbildes, wie sie bei Normalmäusen 4 - 24 Stunden nach Gabe von Milz - und Serumextrakt milzbestrahlter Ratten beobachtet wurden. Diese Paral-

leilität kann dadurch erklärt werden, daß durch den Zerfall der implantierten Milzzellen ähnlich wirksame Substanzen entstanden sind wie nach Milzbestrahlung.

zu IV. 2. a):

Nachdem am 6. Tage nach Transplantation der Tumorzellen bezüglich der Normalwerte die Anzahl der Granulozyten verzehnfacht und die der Lymphozyten verdreifacht waren, bewirkte die Injektion unserer Extrakte eine Veränderung des weißen Blutbildes in Richtung der Verhältnisse während der initialen Krankheitsphase, was in diesem Zusammenhang einem gewissen Therapieerfolg gleichkommt.

zu IV. 2.b) :

Auf dem Höhepunkt des Krankheitsverlaufes ist die Milz mit einer Massenvermehrung um das 6,5-fache ihrer Norm schon so stark in das Krankheitsgeschehen einbezogen, daß im Wesentlichen nur noch das Knochenmark eine gewisse Reaktion auf Milz - und Serumextraktinjektion im Sinne einer Granulozytopenie zeigt.

zu IV. 2. c):

Bei Lymphadenosemäusen ist ein deutlicher 24-Stunden-Effekt nicht mehr nachweisbar.

Daß in der ersten Krankheitsphase die Reaktion der Tumorempfänger der von Normalmäusen nach Milz - und Serumextraktinjektion entspricht ist verständlich, denn bei ihnen ist ja nicht primär das hämopoetische System erkrankt. COHN schreibt dazu:
" Man kann nicht behaupten, daß die Leukose übertragbar ist und die eigenen Lymphozyten des Empfängers Malignität annehmen. Es ist wohl so, daß die transplantierten Zellen selbständig weiterwachsen und so vom Empfänger toleriert werden, weil sie von Tieren mit genetischer Einheitlichkeit stammen."
(zit. nach (4) S. 299).

Unsere Befunde an Lymphadenosemäusen sprechen dafür, daß der Extrakt aus röntgenbestrahlten Rattenmilzen einen regulierenden Einfluß sowohl auf die Tätigkeit des Knochenmarks als auch auf die der Milz

ausübt. Dies steht im Einklang mit Arbeiten von SCHOEN und BAUER, nach denen durch Milzbestrahlung wahrscheinlich ein Milzfaktor freigesetzt wird, der regulierend auf das Knochenmark einwirkt (18). Auch SHOHET und GARDNER führen die Kontrolle der Leukopoese auf einen Rückkopplungsmechanismus zurück, welcher durch die Auflösungsprodukte von Leukozyten aus der bestrahlten Milz hervorgerufen wird (19).

Die von uns durchgeführte Analyse der biologischen Aktivität von Extrakten aus Milz und Serum milzbestrahlter Ratten weist auf therapeutische Möglichkeiten bei hämatologischen Erkrankungen hin.

VI. Zusammenfassung

1. Die Injektion von eiweißarmen Extrakten aus Milzen und Serum milzbestrahlter Ratten bewirkt bei der normalen Maus eine Leukopenie durch Lymphopenie sowie eine Granulozytose.
2. Nach der Injektion dieser Extrakte wird bei Mäusen mit akuter lymphatischer Leukämie eine Remission erzielt, die durch einen der initialen Krankheitsphase entsprechenden Zustand gekennzeichnet ist.
3. Bei den Extrakten handelt es sich wahrscheinlich um Kernfragmente junger Lymphozyten.

VII. Literaturverzeichnis

- 1 Albert, Hans - Henning v.: Die Wirkung von eiweißfreien Milzextrakten auf die Tetrahydrofolat - Formylase in menschlichen Leukozyten. Klin. Wschr. 43 (1965) 751
- 2 Allen, B.R., H.G. Wardell, M. Clay : Postirradiation Protection of Rabbits by Injektion of "Splenic" Plasma. Science 123 (1956) 1080
- 3 Astaldi, G., R. Airo, G. Costa, N. Duarte : Milzbestrahlung und immunologische Antwort peripherer Lymphozyten von lymphatischen Leukämien. Blut, 13 (1966) 100
- 4 Cohrs, P. : Pathologie der Laboratoriumstiere I. Springer, Heidelberg 1958
- 5 Cole, L.J., M.C. Fishler, M.E. Ellis, V.P. Bond: Protection of Mice Against X - Irradiation by Spleen Homogenates Administered After Exposure. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 80 (1952) 112
- 6 Dalos, B.: Factor in Serum inhibiting Bone Marrow Mitosis after X - Irradiation of the Spleen. Nature (212) (1966) 1252
- 7 Dameshek, W.: Hypersplenism. The Bulletin (1955) 113
- 8 Diethelm, L., W. Lorenz: Hämatologische Studien an der röntgenbestrahlten Rattenmilz. Blut 10 (1964) 253
- 9 Esposito, S.: Effect on Leukemic Cells of Ribonucleic Acid extracted from Calf's Spleen. Nature 203 (1964) 1078
- 10 Ford, W.L.: The Mechanism of Lymphopenia produced by chronic Irradiation of the Rat Spleen. Brit. J. Exp. Path. 49 (1968) 502
- 11 Fresen, O., H. Kretschmer : Beziehungen zwischen Milz und Hämpoese. Z. ges. exp. Med. 154 (1971) 36

- 12 Lau, P., J. I. Brody, L.H. Beizer : In Vitro Development from Patients with Neutropenia. Blood 29 (1967) 462
- 13 Lindner, E.B., A. Elmqvist, J. Porath: Gel - Filtration as a Method for Purification of Protein - bound Peptides Exemplified by Oxytocin and Vasopressin. Nature 184 (1959) 1565
- 14 Mc Endy, D.P., M.C. Boon, J. Furth : On the Role of Thymus, Spleen, and Gonads in the Development Leukemia in a High - Leukemic Stock of Mice. Cancer Research 4 (1944) 377
- 15 Nettesheim, P., M.G. Hanna jr., W.D. Fisher : Further Studies on the Effect on Serum Alpha Makroglobulin on Regeneration of Haemopoetic Tissue after X - Irradiation. Radiat. Res. 35 (1968) 378
- 16 Porath, J., A.v. Schally : Gel - Filtration of Posterior Pituitary Hormones. Endocrinology 70 (1962) 738
- 17 Pribilla, W. Über einige Funktionen der Milz. Der Internist 8 (1967) 345
- 18 Schoen, D., R. Bauer : Ergebnisse mit der Milz- bestrahlung bei 175 Fällen mit chronischer myeloischer Leukämie. Strahlentherapie 135 (1968) 1
- 19 Shohet, S.B., F.H. Gardner : Tissue Culture of Primitive Human Myeloid Cells for the Study of Cellular Proliferation. Blood 31 (1968) 180
- 20 Skalka, M., J. Matyasova : Post - Irradiation Changes in the Desoxyribonucleoprotein Complex in Animal Tissues as revealed by the Action of Heparin. Nature 212 (1966) 1253
- 21 Swingle, K.F., L.J. Cole : Radiation - Induced Free Polydeoxyribonucleotides in Lymphoid Tissues: A Product of the Action of Neutral Desoxyribo- nuclease (DNase I). Radiat. Res. 30 (1967) 81
- 22 Tarnuzi, A., R. Kennedy Smiley : Hematologic Effects of Splenic Implants. Blood 29 (1967) 373

- 23 Waldschmidt, M. : Das Verhalten von l - Aminio-
säureoxydase und Acetyl - CoA - Dehydrogenase in
den Mitochondrien sowie der Gehalt an Flavin-
adenindinucleotid in Leber und Milz von Ratten
nach Bestrahlung in vivo. Strahlentherapie 132
(1967) 463
- 24 Wolf, H.J., N. Gehrlich : Behandlung von Leukämien
mit Milzextrakten. Verh. dtsh. Ges. inn. Med.
(1955) 266
- 25 Wolters, H.-G., M. Bauer : Zur Frage einer humo-
ralen Wirkung der Milz auf die Regulation der
Erythrozytopoese. Verh. dtsh. Ges. inn. Med.
(1968) 619
- 26 Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden :
Das Molekularsieb Sephadex.
- 27 Sachs, L. : Statistische Auswertungsmethoden.
Springer, Berlin (1969)
- 28 Documenta Geigy : Wissenschaftliche Tabellen.
7. Auflage. J.R. Geigy A.G., Pharma, Basel (1969)
- 29 Siegenthaler, W. : Klinische Pathophysiologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1970)

Lebenslauf

Am 23. Juli 1938 wurde ich als Sohn des Kunstmalers und Musikers Wilhelm Neumayr und seiner Frau Franziska, geb. Rattia, in München als Ältester von acht Geschwistern geboren.

Nach meiner Entlassung aus der Volksschule arbeitete ich zunächst in der Landwirtschaft und begann dann eine Lehre als Kraftfahrzeughandwerker. Während dieser Zeit besuchte ich die landwirtschaftliche Berufsschule und die Berufsschule für Kraftfahrzeughandwerker. Nach Beendigung meiner Lehre trat ich im Dez. 1956 als Soldat auf Zeit in die Bundesmarine ein. Während meiner Dienstzeit bereitete ich mich in Abendkursen und durch Fernlehrgänge auf das Abitur vor.

Im März 1965 legte ich am Städt. Abendgymnasium Kiel die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1966 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin.

Am 16. 6. 1972 legte ich bei der Universität München das medizinische Staatsexamen ab.

München, Juni 1972

